

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-176761

(43)Date of publication of application : 20.07.1993

(51)Int.Cl.

C12N 5/08
C07K 17/10
C12N 11/08
C12P 21/02
//(C12P 21/02
C12R 1:91)
C07K 99:00

(21)Application number : 03-155924

(71)Applicant : BIO MATERIAL KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 31.05.1991

(72)Inventor : TERAMOTO KAZUO
OGAWA TAKAYOSHI
NAKAMURA NORIKO
SUDO TETSUHISA
SANO EMIKO

(54) CELL TREATING AGENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a cell treating agent useful for molded article for cell culture, artificial blood vessel, etc., having activating action on vascular endothelial cell by immobilizing a basic cyclic peptide containing two amino groups to the surface of an insoluble carrier.

CONSTITUTION: A basic cyclic peptide containing two amino groups is immobilized to the surface of an insoluble carrier which is in a form of laboratory dish, bottle, yarn, hollow yarn, granules or assembled article using these materials and is obtained by introducing an active halogen group to the surface of a molded article of a vinyl polymer consisting essentially of a-styrene to give the objective cell treating agent. The treating agent is brought into contact with cells to give a cytokinin such as interleukin 6.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-176761

(43)公開日 平成 5 年(1993) 7 月20日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 5/08				
C 0 7 K 17/10		7731-4H		
C 1 2 N 11/08	B	2121-4B		
C 1 2 P 21/02	F	8214-4B		
		7236-4B		
			C 1 2 N 5/ 00	E

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全 4 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-155924

(22)出願日 平成 3 年(1991) 5 月31日

(71)出願人 591082269

株式会社バイオマテリアル研究所
神奈川県横浜市栄区田谷町 1 番地

(72)発明者 寺本 和雄

神奈川県横浜市栄区田谷町 1 番地 株式会
社バイオマテリアル研究所内

(72)発明者 小川 恭喜

神奈川県横浜市栄区田谷町 1 番地 株式会
社バイオマテリアル研究所内

(72)発明者 中村 紀子

神奈川県横浜市栄区田谷町 1 番地 株式会
社バイオマテリアル研究所内

(74)代理人 弁理士 須藤 政彦 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞処理剤

(57)【要約】

【構成】 不溶性担体の表面に 2 個のアミノ基を持つ塩基性環状ペプチドを固定化して成る細胞処理剤、及び血管内皮細胞等を当該細胞処理剤と接触させることを特徴とするサイトカインの製造方法。

【効果】 組織系細胞に作用させて各種サイトカイン等の有用物質を高濃度で産生させることが可能であり、細胞培養用成形品、人工血管等の形で利用できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 不溶性担体の表面に2個のアミノ基を持つ塩基性環状ペプチドを固定化して成る細胞処理剤。

【請求項2】 不溶性担体の形状が、シャーレ、瓶、膜、繊維、中空糸、粒状物またはこれ等を用いた組み立て品であることを特徴とする請求項1記載の細胞処理剤。

【請求項3】 細胞を請求項1記載の細胞処理剤と接触させることを特徴とするサイトカインの製造方法。

【請求項4】 細胞が血管内皮細胞であることを特徴とする請求項3記載のサイトカインの製造方法。

【請求項5】 サイトカインがインターロイキン-6であることを特徴とする請求項3記載のサイトカインの製造方法。

【請求項6】 不溶性担体がスチレンまたは α -メチルスチレンを主体とするビニル重合体成型品の表面に活性ハロゲン基を導入したものであることを特徴とする請求項1記載の細胞処理剤。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】本発明は、血管内皮細胞等の組織系細胞に作用してサイトカイン等の有用物質を産生させる細胞培養用成型品等の細胞処理剤に関する。

【従来の技術】生理活性物質を不溶性担体に固定化したものはアフィニティークロマトグラフ用吸着剤、治療用血液処理剤、細胞培養用機材、抗菌性材料、その他、分析用試薬などとして広く利用されており、今後、さらに幅広い応用が機体される重要な分野である。線維芽細胞、血管内皮細胞、皮膚ケラチン細胞等で代表される組織系細胞はインターフェロン、インターロイキン-1

(IL-1)、インターロイキン-6(IL-6)等の有用なサイトカインを産生することで知られている。特に、血管内皮細胞は血液接触部に存在する細胞であるが、組織プラスミノゲンアクチベーター、プロスタサイクリン、アンジオテンシンII、レニン、IL-1、IL-6等の有用物質を産生することが知られており、生体外での血管内皮細胞の培養は、人工血管の製造のほか、これら有用物質の生産を可能にする意味で、近年、とりわけ注目されている。ヒトの臍帯静脈や皮膚毛細血管をマトリゲル添加コラーゲンゲル上で培養すると、管形成の起きることが知られている【ヤスオ クボタほか、ジャーナル オブ セル バイオロジー、107 1589(1988)】。また、体外での血管内皮細胞の培養液に、IL-1【マリナ シロニほか、ザ ジャーナル オブイミヌロジー、142、549(1989)】やリボポリサツカライド【フランク R. ジリクほか、ザ ジャーナル オブイミヌロジー、142、144(1989)】を加えることによつて、IL-6の産生が促進されることが知られている。しかし、これらには、添加するものが高価な蛋白質であつたり、あるいは、構造の複雑な有毒物質であつたりする等の各

種問題点がある。

【発明が解決しようとする課題】本発明者等は、かかる従来技術の問題点に鑑み、生理活性物質をビニル重合体成型品表面に固定化し、これを動物細胞の培養用容器として使用できないか、また、有用なサイトカイン等の産生誘導剤として使用できないか種々検討した結果、塩基性環状ペプチドのグラミシジンS等を固定化したものが血管内皮細胞にインターロイキン-6等の有用な生理活性物質を産生させ得ることを見出し、本発明に到達した。

【課題を解決するための手段】本発明は以下の(1)～(6)の技術的手段から構成される。

(1) 不溶性担体の表面に2個のアミノ基を持つ塩基性環状ペプチドを固定化して成る細胞処理剤。

(2) 不溶性担体の形状が、シャーレ、瓶、膜、繊維、中空糸、粒状物またはこれ等を用いた組み立て品であることを特徴とする前記(1)記載の細胞処理剤。

(3) 細胞を前記(1)記載の細胞処理剤と接触させることを特徴とするサイトカインの製造方法。

(4) 細胞が血管内皮細胞であることを特徴とする前記(3)記載のサイトカインの製造方法。

(5) サイトカインがインターロイキン-6であることを特徴とする前記(3)記載のサイトカインの製造方法。

(6) 不溶性担体がスチレンまたは α -メチルスチレンを主体とするビニル重合体成型品の表面に活性ハロゲン基を導入したものであることを特徴とする前記(1)記載の細胞処理剤。

本発明でいう2個のアミノ基を持つ塩基性環状ペプチドとしては、4個以上のアミノ酸残基からなる環状ペプチドで2個のアミノ基を持つ塩基性環状ペプチドが使用される。これらの塩基性環状ペプチドであれば、なんでも良く、特に、制限はないが、製造の容易さや効果からアミノ酸の配列に对称心があり、かつ、4～10個のアミノ酸から成るものが好ましい。その代表例として塩基性環状デカペプチドであるグラミシジンSが上げられるが、そのアミノ酸残基の一部を他のアミノ酸で置換したもの、およびアミノ酸を増減させたもの等も使用し得る。これらは生物に作らせることもできるが、化学的にも容易に合成することができる。本発明でいう不溶性担体とは、実質上不溶性でその表面にアミノ基と反応し得る活性ハロゲン基またはカルボキシル基を有する担体を意味する。ここでいう活性ハロゲン基とは α -クロルアセトアミドメチル基、 α -クロルプロピオンアミドメチル基、 α -クロルブチルアミドメチル基、 α -ヨードアセトアミドメチル基等で代表される α -ハロアシルアミドメチル基またはクロルメチル基を意味する。該不溶性担体の形状はシャーレ、瓶、管、膜、繊維、中空糸、粒状物またはこれらを用いた組み立て品のいずれでも良いが、とりわけ、これ等に光透過性があると細胞の管理が

しやすいので好ましい。本発明でいう不溶性担体の具体例を挙げると、①スチレンまたは α -メチルスチレンの単独重合体もしくはこれ等を主成分とする芳香族ビニル系共重合体にクロルメチル基を導入したもの、②スチレン/エチレン・ブチレンのABAブロックコポリマーの膜に α -ハロアセトアミドメチル基を導入したもの、③クロルメチルスチレン・スチレン共重合体、④ポリプロピレン補強ポリスチレン繊維に α -ハロアセトアミドメチル基を導入したもの、⑤無水マレイン酸・スチレン共重合体等が挙げられるが、これ等に限定されるものではない。本発明の細胞処理剤の製造は、活性ハロゲン基を持つ不溶性担体を2個のアミノ基を持つ塩基性環状ペプチドの溶液中に塩基性条件下で浸漬するか、カルボキシル基を持つ不溶性担体を2個のアミノ基を持つ塩基性環状ペプチドとカルボジイミドとの混合溶液に加えることにより容易に達成される。この反応において、溶液のpHが12.5以上であると、ペプチドが急激に加水分解し、また、逆にpHが低すぎると、反応が進まないの

で、溶液のpH9以上、12以下であることが必要である。本発明でいうサイトカインとは組織プラスミノゲンアクチベータ、プロスタサイクリン、アンギオテンシンII、レニン、IL-1、IL-6、コロニー刺激因子などを意味する。とりわけ、IL-6は種々の細胞に作用して、細胞の分化や増殖を誘導すること、特に、造血幹細胞に対する作用のあることで最近注目されている〔実験医学 7 (15) (増刊) 90-95 (1989)〕。血管内皮細胞を本発明の細胞処理剤と接触させながら培養することにより、細胞は活性化されて、実施例に示すような高濃度のIL-6が産生されるほか、同様に組織プラスミノゲンアクチベータ、プロスタサイクリン、アンギオテンシンII、レニン、IL-1、コロニー刺激因子などのサイトカインが産生されることが確認された。さらに、2個のアミノ基を持つ他の塩基性環状ペプチドを使用した場合についても同様に各種サイトカインが産生されることが確認された。産生されたサイトカインのうち、例えば、IL-6はin vivo およびin vitroでの白血球増加剤等として利用できる。また、本発明の細胞処理剤の利用としては細胞培養用器具等の成型品、人工血管等への利用が挙げられる。

【発明の効果】本発明の細胞処理剤は血管内皮細胞等を活性化する作用を有しており、細胞を当該細胞処理剤と接触させながら培養することにより、IL-6、組織プラスミノゲンアクチベータ、プロスタサイクリン、アンギオテンシンII、レニン、IL-1、コロニー刺激因子等の各種サイトカインを高濃度で産生されることができる。産生されたサイトカインのうち、例えば、IL-6は、in vivo およびin vitroでの白血球増加剤等として有用なものである。さらに、本発明の細胞処理剤は、細胞培養容器等の細胞培養用成型品、人工血管等の形で利用できる長所がある。以下、実施例により本発明

をさらに具体的に説明する。なお、実施例中の評価方法は、以下に従った。

1. ビニル系重合体成型品の化学的解析

成型品を塩化メチレンでソックスレー抽出すると不溶性の膜状物が得られるので、これを真空乾燥し、重量を計り、赤外線吸収スペクトル測定等を行つた。

2. 赤外線吸収スペクトル

島津フーリエ変換赤外分光光度計FTIR-4300を用い、KBr錠剤法で測定した。

3. 成型品の光透過性の測定

島津分光光度計UV2100を用い、500ナノメートルで板状成型品に垂直方向の吸光度を測定した。対照として同じ厚さのポリスチレン板状成型品の吸光度を測定し、両者の差を A_{500} とした。従つて、その値が小さいほど成型品の光透過性が高いことになる。

4. ペプチドの定量

固定化成型品を6N-HClで加水分解した後、日立自動アミノ酸分析計（特殊アミノ酸分析法/ニンヒドリン発色）で分析した。アミノ酸の組成から固定化量を求めた。

5. サイトカインの定量

ヒトIL-6はRアンドDシステムズ社（ミネアポリス、USA）のグウォンテイカイン・ヒトIL-6・E LISAキットにより定量した。

【実施例1】1-ニトロプロパン500mlと硫酸272mlの混合溶液を0℃に冷却し、20.4gのN-メチロール- α -クロルアセトアミドを加え、0~10℃で溶解した。この溶液を10℃に昇温した後、3.5cm ϕ ×1.0cmHのポリスチレン製培養皿（厚み1mm）70個に7mlずつ入れ、室温で1hr反応させた。次に、反応液を捨て、培養皿を零下20℃のメタノールに浸し、さらにメタノールおよび水で洗った後、真空乾燥して、内部の表面だけクロルアセトアミドメチル化された成型品Aを得た。この成型品の A_{500} は0.030であつた。上記で得た成型品A1個を、塩化メチレンでソックスレー抽出したところ、薄膜状の不溶物3.2mgが得られた。培養皿の反応面の表面積は17.6cm²であるので、反応部の厚みは大体1.8 μ と考えられる。また、この不溶物の赤外線吸収スペクトルでは、1659cm⁻¹（アミド-I）、1529cm⁻¹（アミド-II）および3297cm⁻¹（N-H）にアミド基の強い吸収が認められたことからその構造を確認した。この溶液5mlずつを20個の成型品Aに入れ、室温で5日間静置した。溶液を捨て、成型品をエタノールで5回、水で2回、pH3の希塩酸で1回、水で5回洗浄して、グラミシジンSを固定化した本発明細胞処理剤である成型品Iを得た。成型品Iには119 μ のグラミシジンSが固定化されていることが、アミノ酸分析の結果、わかつた。また、オルニチンの回収率が45%であつたことから、グラミシジンS分子は2個の塩基

性アミノ基のうちの一個で成型品（クロルアセチル基と反応）と結合していることがわかった。また、XPS分析の結果、元素組成から表面に存在する芳香核の6%がグラミシジンSとの結合に関与していることがわかった。

【実施例2】ウシ脳抽出液含有低血清血管内皮細胞増殖培地（EGM-UV：倉敷紡績（株））中に正常ヒト臍帯血管内皮細胞（倉敷紡績（株））を 4.4×10^4 個/mlの濃度で含む細胞液2mlを、実施例1で得た成型品I（紫外線照射滅菌）に入れて、インキュベーター中（37℃、5%CO₂）で48hr培養した。比較として、実施例1で得た成型品AおよびAにポリミキシンBを固定したもの（固定化量：110μg/皿、紫外線照射滅菌）および市販の細胞培養皿MS-10350（住友ベークライト（株））で同様に培養した。各培養上清を取ってその中のIL-6を調べたところ、グラミシジンSを固定化した本発明の皿では85pg/mlであつたのに対し、成型品Aでは8pg/ml、ポリミキシンBを固定化した皿では37pg/ml、MS-10*

*350では37pg/mlであつた。この結果から、IL-6産生誘導能は本発明の成型品が著しく優れていることがわかった。

【実施例3】実施例2と同様に、EGM-UV培地中に正常ヒト臍帯血管内皮細胞を 1.3×10^4 個/mlの濃度で含む細胞液2mlを、実施例1で得た成型品I（紫外線照射滅菌）に入れて、インキュベーター中（37℃、5%CO₂）で24hrおよび48hr培養した。比較として、実施例1で得た成型品Aおよび市販の細胞培養皿MS-10350（住友ベークライト（株））で同様に培養した。各培養上清を取ってその中のIL-6を調べたところ、グラミシジンSを固定化した本発明の皿では24hr培養で290pg/ml、48hr培養で430pg/mlであつたのに対し、成型品Aでは48hr培養で86pg/ml、MS-10350では24hr培養で100pg/ml、40hr培養で135pg/mlであつた。この結果から、IL-6産生誘導能は本発明の成型品が著しく優れていることがわかった。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.³

識別記号

弁内整理番号

F I

技術表示箇所

//(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

C 0 7 K 99:00

8318-4H

(72)発明者 須藤 哲央

神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 株式会社
バイオマテリアル研究所内

(72)発明者 佐野 恵海子

神奈川県横浜市旭区中希望ヶ丘212-21
株式会社バイオマテリアル研究所内